

Vollständige Umkehrung der Enantioselektivität gegen acetylierte tertiäre Alkohole durch eine Doppelmutation in einer Esterase aus *Bacillus subtilis***

Sebastian Bartsch, Robert Kourist und Uwe T. Bornscheuer*

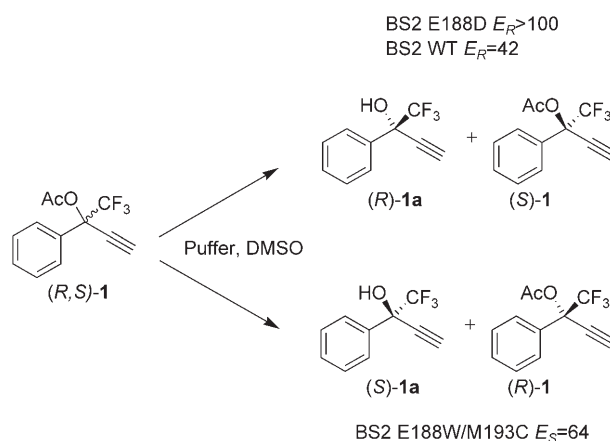
Zur Synthese enantiomerenreiner Verbindungen werden häufig Biokatalysatoren eingesetzt, da diese wegen ihrer hohen Chemo-, Regio- und Stereoselektivität der chemischen Katalyse oft überlegen sind;^[1] allerdings zeigen die Wildtypen (WTs) der Enzyme oft keine breite Substratspezifität in Kombination mit einer ausreichend hohen Selektivität. Diese Einschränkungen können durch rationales Proteindesign oder gerichtete Evolution beseitigt werden. Oft ließ sich die Enantioselektivität durch diese Methoden steigern, eine Umkehrung der Enantioselektivität gelang aber nur in Ausnahmefällen.^[2] Interessant für die Synthese sind nur E -Werte > 50 – eine Schwelle, die nur schwer zu überwinden ist, wenn man von einem Enzym mit entgegengesetzter Enantioselektivität ausgeht. Beispielsweise änderten May et al. eine D-selektive Hydantoinase in eine L-selektive Variante, mit der allerdings nur 20% ee erreicht werden konnten,^[2d] und Zha et al.^[2e] invertierten die Enantioselektivität einer Lipase aus *Ps. aeruginosa* bis zu $E = 30$. Zudem können die Varianten deutlich an katalytischer Aktivität einbüßen, wie dies für eine Arylmalonat-Decarboxylase mit invertierter Enantioselektivität beschrieben wurde.^[3] Daher zählt die Umkehrung der Enantiopräferenz immer noch zu den anspruchsvollsten Aufgaben des Proteindesigns.

Eine Esterase von *Bacillus subtilis* (BS2) wurde den GGG(A)X-Hydrolasen zugeordnet^[4] und zeigt dementsprechend Aktivität gegenüber Estern tertiärer Alkohole. Esterasen, die das häufigere GX-Motiv in der Oxyaniontasche enthalten, sind hingegen wegen ihres kleineren aktiven Zentrums nicht gegen diese sterisch recht anspruchsvollen Ester aktiv. Mit den Mutanten G105A und E188D wurden zwei Varianten mit exzellenter R -Enantioselektivität ($E > 100$) gegen den Ester **1** hergestellt, während der Wildtyp eine Enantioselektivität von $E_R = 42$ aufweist.^[5] Optisch aktive tertiäre Alkohole sind wichtige Bausteine für die organische Synthese^[6] und wurden kürzlich zur Herstellung eines oral aktiven A_{2A} -Rezeptorantagonisten in einem Maus-Katalepsiemodell verwendet.^[7] Darüber hinaus sind fluoridierte optisch aktive Alkohole von großem Interesse, da sie in ferroelek-

trischen Flüssigkristallen und Wirkstoffen Verwendung finden können.^[8]

Auf der Basis einer vorangegangenen Studie zum rationalen Proteindesign^[5a] berichten wir hier über die Strategie einer fokussierten gerichteten Evolution zur Inversion der Enantioselektivität der Esterase BS2 gegen acetylierte tertiäre Alkohole (Schema 1).

Durch Computer-Modeling identifizierten wir kürzlich^[5a] den Rest E188, der einen starken Einfluss auf die Enantio-



Schema 1. Die kinetische Racematspaltung von *rac*-**1** mit Esterase-Wildtyp von *Bacillus subtilis* (BS2) und mit der Einfachmutante E188D führt zum R -Alkohol (oben), während mit der Doppelmutante E188W/M193C der S -Alkohol gebildet wird (unten).

selektivität der Esterase BS2 gegen acetylierte tertiäre Alkohole ausübt: Während die Mutante E188D einen E -Wert von $E_R > 100$ für **1** aufwies, zeigte die Mutante E188F eine umgekehrte Enantiopräferenz ($E_S = 3$). Diese Beobachtung veranlasste uns, eine fokussierte gerichtete Evolution, basierend auf Sättigungsmutagenese in Anlehnung an die von Reetz und Mitarbeitern entwickelte CASTing-Methode,^[9] durchzuführen. Anhand der Kristallstruktur der hochhomologen BsubpNBE-Esterase (pdb-Eintrag: 1QE3^[10]) wurden die drei benachbarten Aminosäuren E188, A190 und M193 als Ziele ausgesucht, da diese sowohl in das aktive Zentrum zeigen als auch um die katalytische Triade angeordnet sind. Anschließend wurde durch gleichzeitige Sättigungsmutagenese an diesen drei Positionen unter Verwendung degenerierter, NNK-Codons tragender Primer eine fokussierte Bibliothek hergestellt, was theoretisch zu $20^3 = 8000$ Varianten führt.

[*] S. Bartsch, R. Kourist, Prof. U. T. Bornscheuer
Institut für Biochemie
Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-80066
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

[**] Unser Dank gilt Prof. Karl Hult, Linda Fransson und Martin Veld (KTH, Stockholm, Schweden) für nützliche Diskussionen und eine Einführung in das Docking-Programm.

Die resultierende Bibliothek von 2800 Mutanten wurde zunächst einem Vortest auf Agarplatten unterzogen, in dem nur ca. 40% aller Klone noch Esteraseaktivität zeigten. Um ein effizientes Hochdurchsatz-Screening der verbliebenen Mutanten zu ermöglichen, wurde ein schon früher entwickelter spektrophotometrischer Assay angewendet, der auf der Quantifizierung der entstehenden Essigsäure beruht, die durch ein Multienzymsystem zu NADH umgesetzt wird.^[11] Durch Einsatz von enantiomerenreinem (*S*)-**1** oder (*R*)-**1** in separaten Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurde die scheinbare Enantioselektivität E_{app} von ca. 1100 Klonen bestimmt. Als beste Mutante stellte sich die Doppelmutante E188W/M193C heraus, die eine inverse Enantioselektivität ($E_S = 64$) für **1** aufwies, was auch durch eine Racematspaltung im präparativen Maßstab bestätigt wurde. Darüber hinaus zeigte die Mutante eine immer noch befriedigende spezifische Aktivität gegen *para*-Nitrophenylacetat (pNPA; 46.5 U mg⁻¹; 14% der WT-Aktivität). Somit konnte die Enantioselektivität für **1** von $E_R > 100$ (E188D) auf $E_S = 64$ umgekehrt werden.

Anschließend wurden die beiden Einzelmutanten hergestellt, um zu bestimmen, welche Mutationen zu der beträchtlichen Umkehrung der Enantioselektivität beitragen. Dabei stellte sich heraus, dass nur die Doppelmutante hoch *S*-selektiv war: E188W zeigte mäßige *S*-Enantioselektivität ($E_S = 26$) und eine sehr geringe Aktivität, wohingegen M193C immer noch eine *R*-Präferenz mit $E_R = 16$ aufwies, aber WT-ähnliche Aktivität hatte. Daraus folgt, dass es nur durch die gleichzeitige Sättigungsmutagenese möglich war, eine Esterase-Variante herzustellen, die eine invertierte und präparativ nützliche Enantioselektivität und Aktivität aufweist.

Um die molekularen Grundlagen der Inversion der Enantiopräferenz zu verstehen, führten wir Moleküldynamiksimulationen des ersten tetraedrischen Übergangszustandes (TI1) in der Esterase BS2 durch. Im WT konnten drei sterisch mögliche Orientierungen für jedes Enantiomer identifiziert werden. Da die verschiedenen Orientierungen keine Unterschiede in der Stabilität zeigten, nahmen wir an, dass TI1 nicht die Enantioselektivität bestimmt. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits für die GGG(A)X-Hydrolase *C. rugosa*-Lipase beschrieben.^[12] Alternativ wurden automatisierte Docking-Experimente durchgeführt, die eine einzige produktive Orientierung für jedes Enantiomer von **1** im aktiven Zentrum des BS2-WT lieferten. Die beobachtete *R*-Präferenz des WT lässt sich dadurch erklären, dass das *R*-Enantiomer eine niedrigere Energie aufweist (−4.31 kcal mol⁻¹) als das *S*-Enantiomer (−3.92 kcal mol⁻¹). Zusätzlich stimmten die Orientierungen bei erfolgreichem Docking der beiden Enantiomere von **1** exakt mit je einer der zuvor von uns in Moleküldynamiksimulationen beobachteten Orientierungen überein.

Docking-Experimente mit einem Modell der Doppelmutante E188W/M193C zeigten, dass die Substitution von Glu188 zu Trp eine sterische Abstoßung des bevorzugten *R*-Enantiomers von **1** im WT verursacht, was zu einem *S*-selektiven Enzym führt (Abbildung 1). Darüber hinaus konnte keine produktive Orientierung für das *R*-Enantiomer von **1** in der Doppelmutante identifiziert werden. Das *S*-Enantiomer zeigte die gleiche produktive Orientierung wie das *S*-Enantiomer im WT, aber bei niedrigerer freier Energie als beim

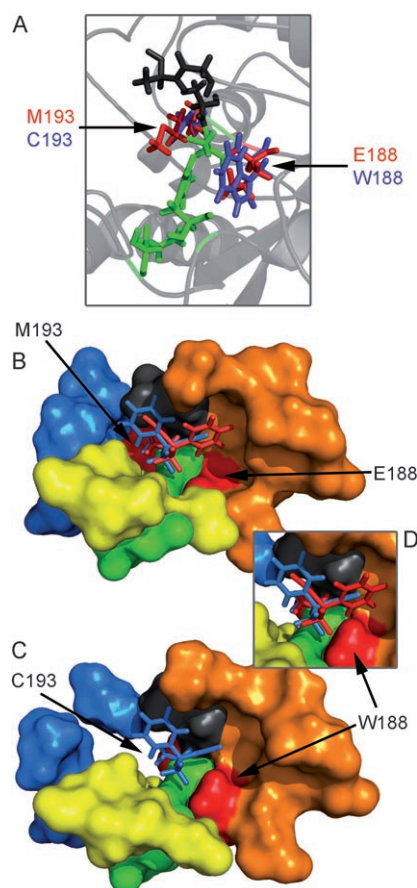
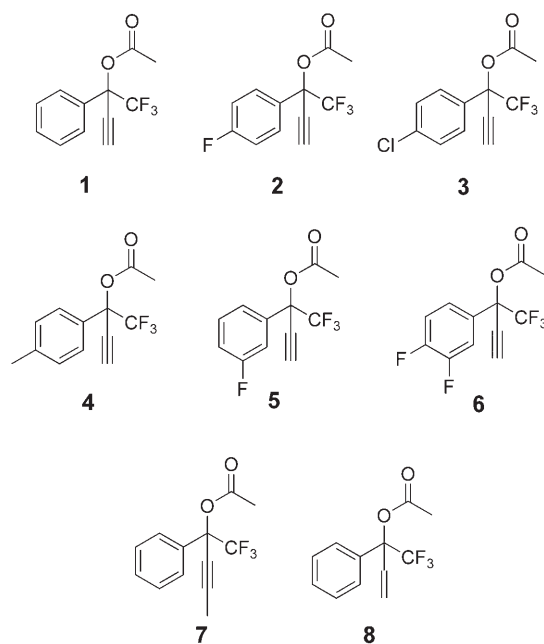


Abbildung 1. A) Vergleich der aktiven Zentren des BS2-WT und der Doppelmutante. Aminosäuren des WT (E188/M193) sind rot, die der Doppelmutante (W188/M193) blau hervorgehoben. B) Vergleich der bevorzugten Orientierungen von (*R*)-**1** (blau) und (*S*)-**1** (rot), gedockt ins aktive Zentrum des BS2-WT. C) (*S*)-**1** im aktiven Zentrum der Doppelmutante E188W/M193C. D) Vergleich der bevorzugten Orientierungen von (*S*)-**1** (blau) und dem überlagerten (*R*)-**1** (rot) in E188W/M193C. Phenylbindungstasche: orange; Ethinylbindungstasche: blau; Trifluorbindungstasche: gelb; Oxyanionloch: schwarz; katalytische Triade: grün.

Wildtyp. Der synergistische Effekt von M193C kann bislang nicht erklärt werden, er scheint aber die bevorzugte *S*-Orientierung zu stabilisieren.

Die Doppelmutante hat auch ein breiteres Substratspektrum als das Wildtypenzym (Schema 2). Wir hatten bereits vom Einfluss der Mutationen E188D und G105A auf die Substratspezifität von BS2 berichtet^[13] und fanden nahezu keine Aktivität gegen die Substrate **5** und **6**. Substrat **4** wurde nur von der G105A-Mutante umgesetzt. Mit der Doppelmutante E188W/M193C war es nun möglich, alle Substrate **1–6** mit entgegengesetzter Enantioselektivität im Vergleich zu E188D und G105A umzusetzen (Tabelle 1). **7** und **8** konnten bisher von keiner Variante umgesetzt werden. Die Doppelmutante zeigte hingegen hohe Enantioselektivität für **5** sowie gute Enantioselektivität für **6** und ist somit das erste bekannte Enzym, dass gegen diese Substrate aktiv ist.

Die Erweiterung des Substratspektrums durch Austausch des Glutamatrestes an Position 188 gegen Tryptophan kann auch mithilfe eines Computermodells erklärt werden: Die



Schema 2. Die verwendeten Acetate der tertiären Alkohole 1–8.

Tabelle 1: Eigenschaften von E188W/M193C bei der kinetischen Racematspaltung von 1–8.

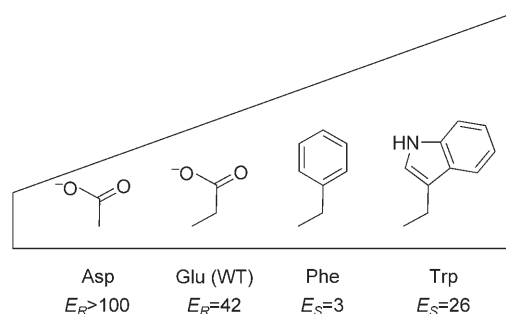
	$ee_s^{[a]}$ [%]	$ee_p^{[a]}$ [%]	$C^{[b]}$ [%]	$E^{[c]}$
1	67	93	42	64
2	68	93	42	53
3	63	94	40	65
4	91	99	48	> 100
5	58	98	37	> 100
6	29	89	24	23
7	n.b. ^[d]	n.b. ^[d]	< 1	n.b. ^[d]
8	n.b. ^[d]	n.b. ^[d]	< 2	n.b. ^[d]

[a] Durch GC-Analyse an chiraler Säule bestimmt. [b] Umsatz; 200-U-BS2-Doppelmutante, bestimmt nach 20 min. [c] Berechnet aus ee_s und ee_p . [d] Nicht bestimmt.

Phenylgruppe des *S*-Enantiomers zeigt aus dem aktiven Zentrum heraus (Abbildung 1B), was dort eine größere Variabilität ermöglicht. Die Phenylgruppe des *R*-Enantiomers hingegen zeigt in die Phenyl-Bindungstasche des WT, und daher ist die Größe der Substituenten beschränkt. In allen Fällen ist die Trifluormethylgruppe in Richtung des His399-Restes der katalytischen Triade orientiert.

Die durch fokussierte gerichtete Evolution erzeugte, hohenantioselektive Doppelmutante E188W/M193C der BS2-Esterase weist eine Enantiopräferenz auf, die derjenigen des WT und der hochselektiven Mutanten E188D und G105A entgegengesetzt ist. Diese Befunde konnten mithilfe von Docking-Experimenten erklärt werden. Eine Untersuchung des Substratspektrums der Doppelmutante vertiefte das Verständnis der molekularen Grundlagen der Enantioselektivität der BS2-Esterase für acetylierte tertiäre Alkohole. Zusätzlich verdeutlichen diese Arbeiten die bedeutende Rolle der Position Glu188 in BS2: Sie ist ausschlaggebend für die promiskuitive Amidaseaktivität^[14] sowie insbesondere für

Präferenz und Ausmaß der Enantioselektivität. Dies wird offensichtlich, wenn die Größe der Aminosäuren an der Position 188 schrittweise von Asp zu Trp vergrößert wird, was zu einer stetigen Veränderung der Enantioselektivität und -präferenz der BS2 führt (Schema 3).



Schema 3. Einfluss des Restes 188 auf die Enantioselektivität und -präferenz der BS2. Kleine Reste führen zu einer *R*-, große zu einer *S*-Präferenz. *E*-Werte für E188D und E188F wurden bereits veröffentlicht.^[5a]

Experimentelles

Tertiäre Alkohole wurden wie zuvor beschrieben^[13] aus den kommerziell verfügbaren Ketonen hergestellt. Die Aktivitäten von BS2-WT und der Doppelmutante wurden durch Hydrolyse von *para*-Nitrophenylacetat ermittelt (1 U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$). Die spezifische Aktivität der aufgereinigten Enzyme wurde zu 333 U mg^{-1} (WT) und 46.5 U mg^{-1} (Doppelmutante E188W/M193C) bestimmt. Die präparativen Biokatalysen zur Gewinnung von (*S*)-**1** und (*R*)-**1a** wurden wie bereits beschrieben^[13] unter Verwendung von 500 mg **1** und 1500 U der BS2-Mutante G105A durchgeführt. Der Alkohol (*R*)-**1a** wurde anschließend mit Acetylchlorid acetyliert. Die Mutantenbibliothek wurde durch positionsgerichtete Mutagenese unter Verwendung degenerierter Primer mit NNK-Codons hergestellt. Für die Overlay-Agar-Aktivitätsfärbung wurde die Mutantenbibliothek auf Agarplatten (versetzt mit Luria-Bertani (LB)-Medium, Ampicillin und Rhamnose) übertragen und nach Inkubation bei 37 °C 5 h durch eine Agar-Agar-Lösung mit Fast Red und α -Naphthylacetat überschichtet. Aktive Klone, die eine Rotfärbung zeigen, wurden in Mikrotiterplatten (MTPs) transferiert, kultiviert, exprimiert und anschließend durch Lysepuffer aufgeschlossen. Der Acetat-Assay wurde wie beschrieben^[13] durchgeführt, mit der Abweichung, dass die Substrate (*R*)-**1** und (*S*)-**1** (1 mM, gelöst in DMSO, 10 % v/v) zunächst im Kit-Puffer gelöst wurden und anschließend die weiteren Kit-Komponenten hinzugefügt wurden. Zu 170 μL Acetat-Assay-Fraktionierung mit enthaltenem Substrat wurden 20 μL der löslichen Fraktion der aufgeschlossenen Zellen hinzugefügt. Die Absorption wurde bei 340 nm über 30 min gemessen. Die scheinbaren *E*-Werte E_{app} wurden aus der Steigung der Geraden berechnet, die aus der Auftragung der NADH-Konzentration gegen die Zeit resultiert. Biokatalysen im analytischen und präparativen Maßstab sowie GC-Analysen wurden wie beschrieben durchgeführt.^[11] Präparative Reaktionen unter Einsatz von 700 U BS2 E188W/M193C mit 125 mg **1** ergaben 30 % (*R*)-**1** (64 % *ee*) und 17 % (*S*)-**1a** (94 % *ee*) bei $E_S = 59$ und $C = 41$ %. 3600 U E188W/M193C wurden für die kinetische Racematspaltung von 200 mg **6** verwendet und führten zu 41 % **6** (58 % *ee*) und 33 % **6a** (92 % *ee*) bei $E = 48$ und $C = 39$ %.

Die Moleküldynamikstudien erfolgten in einer periodischen Wasserbox mit der YASARA-Software (Version 7.4.22) und dem

AMBER99-Kraftfeld unter Verwendung langreichweitiger elektrostatischer Kräfte mit einem „Cut-Off“ bei 7.86 Å (Particle-Mesh-Ewald).^[15] Das Kraftfeld der Substrate wurde durch AutoSMILES-Kraftfeldrechnungen zugewiesen.^[16] Nachdem das Lösungsmittel hinzugefügt und die Zelle neutralisiert worden war sowie die pK_s-Werte vorhergesagt worden waren,^[17] folgten 500-ps-Simulationen bei 35 °C, pH 7 und einer Wasserdichte von 0.997 g L⁻¹. Jeder Simulationsschritt enthielt je einen 1.25-fs-Schritt für inter- und intramolekulare Kräfte.

Die Docking-Experimente wurden mit AutoDock4^[18] und AutoGrid4 in Kombination mit den AutoDock-Tools^[19] durchgeführt. Im ersten Schritt wurde eine Gitterbox definiert (45 × 45 × 45 Punkte mit einem Gitterabstand von 0.375 Å), die den Raum für das Docking-Experiment vorgibt. Die Box wurde auf das katalytische Ser189 zentriert. Im zweiten Schritt wurde der Larmarcksche genetische Algorithmus mit maximal 15 Mio. Energieberechnungen und maximal 2700 Generationen verwendet. Es wurden 100 unabhängige Berechnungen durchgeführt, jeweils beginnend mit einer Population von 150 Individuen. Drei der fünf möglichen Torsionswinkel der Substrate waren mit 20°/Schritt aktiv. Alle anderen Einstellungen entsprachen den Voreinstellungen des Programms.

Eingegangen am 5. Oktober 2007

Online veröffentlicht am 18. Januar 2008

Stichwörter: Alkohole · Enantioselektivität · Enzyme · Esterasen · Gerichtete Evolution

- [1] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137.
- [2] a) M. Ivancic, G. Valinger, K. Gruber, H. Schwab, *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 109; b) Y. Koga, K. Kato, H. Nakano, T. Yamane, *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 585; c) A. O. Magnusson, M. Takwa, A. Hamberg, K. Hult, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4658; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4582; d) O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317; e) D. X. Zha, S. Wilensek, M. Hermes, K. E. Jaeger, M. T. Reetz, *Chem. Commun.* **2001**, 2664; f) R. H. H. van den Heuvel, M. W. Fraaije, M. Ferrer, A. Mattevi, W. J. H. van Berkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9455; g) Y. Li, S. D. Aubert, E. G. Maes, F. M. Raushel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8888; h) Y. Hirose, K. Kariya, Y. Nakanishi, Y. Kurona, K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1063; i) G. J. Williams, T. Woodhall, L. M. Farnsworth, A. Nelson, A. Berry, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16238.
- [3] Y. Terao, Y. Ijima, K. Miyamoto, H. Ohta, *J. Mol. Catal. B* **2007**, *45*, 15.
- [4] E. Henke, J. Pleiss, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3338; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3211.
- [5] a) B. Heinze, R. Kourist, L. Fransson, K. Hult, U. T. Bornscheuer, *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, *20*, 125; b) E. Henke, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, J. Pleiss, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 485.
- [6] D. O'Hagan, N. A. Zaidi, R. B. Lamont, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1703.
- [7] G. Yao, S. Haque, L. Sha, G. Kumaravel, J. Wang, T. M. Engber, E. T. Whalley, P. R. Conlon, H. X. Chang, W. F. Kiesman, R. C. Petter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 511.
- [8] F. M. D. Ismail, *J. Fluorine Chem.* **2002**, *118*, 27.
- [9] M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballera, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4264; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192.
- [10] B. Spiller, A. Gershenson, F. H. Arnold, R. C. Stevens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12305.
- [11] M. Baumann, R. Stürmer, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4329; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4201.
- [12] D. Guieysse, C. Salagnad, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, V. Tran, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1807.
- [13] R. Kourist, S. Bartsch, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1393.
- [14] R. Kourist, S. Bartsch, L. Fransson, K. Hult, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 67–69.
- [15] J. M. Wang, P. Cieplak, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049.
- [16] J. M. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 114.
- [17] E. Krieger, T. Darden, S. B. Nabuurs, A. Finkelstein, G. Vriend, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2004**, *57*, 678.
- [18] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639.
- [19] M. F. Sanner, *J. Mol. Graphics Modell.* **1999**, *17*, 57.